

分担研究課題：植物成分由来危険ドラッグの *in vitro* 代謝に関する検討

研究分担者：石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 准教授

$\Delta^9$ -THC-*O*-acetate,  $\Delta^8$ -THC-*O*-acetate,  $11\alpha$ -HHC *O*-acetate 及び  $11\beta$ -HHC-*O*-acetate の  
ヒト肝臓マイクロゾームによる *in vitro* 代謝に関する検討

研究要旨：大麻由来成分である $\Delta^9$ -THC (tetrahydrocannabinol) および $\Delta^8$ -THC は、現在麻薬として規制されている。また、これらの同族体である $11\alpha$ -HHC (hexahydrocannabinol) および $11\beta$ -HHC は、指定薬物として規制されている。昨今、これらの薬物のアセチル化体が流通している。アセチル化体は生体内で容易に加水分解されると推定されるものの、筆者の知る限り、これらの薬物のアセチル化体の酵素的加水分解については未だ証明がなされていない。そこで、本研究では、 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC のアセチル化体を用い、ヒト肝臓マイクロゾーム (HLM)により酵素化学的加水分解が起こるか否か検討した。各カンナビノイドのアセチル化体は、1 mg/mL DMSO 溶液を終濃度 50  $\mu$ g/mL となるよう加えた。酵素反応は 100 mM Tris-HCl (pH 7.4)で行い、プールドヒト肝臓マイクロゾーム (Corning)10  $\mu$ g protein の存在下、終容量 200  $\mu$ L として 37°C でインキュベーションを行い、BEH Shield RP18 Columnを装着したACQUITY UPLC (Waters)により解析した。各々の合成標品と同一の保持時間に $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC が、それぞれ検出され、反応時間依存的に増加し、60 分後にはアセチル化体は殆ど残存しなかった。これらの反応は予め煮沸した HLM によっては起こらなかった。また、カルボキシエステラーゼ阻害剤とプレインキュベーションした HLM を酵素源とした時は、加水分解は殆ど起こらなかった。酵素的加水分解生成物のマススペクトルは、 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC と合致することを UPLC-QTOFMS によって検証した。従って、 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC のアセチル化体はヒト体内で酵素化学的に加水分解され麻薬 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC, および指定薬物  $11\alpha$ -HHC,  $11\beta$ -HHC をそれぞれ生成することが強く示唆された。

研究協力者

李 任時 中国薬科大学  
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部 部長  
花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部 室長

について、医薬品医療機器等法の下に制定されている指定薬物制度に対応し、規制化の検討に必要な科学的データを監視指導・麻薬行政に提供することを目的とする。

近年、日本において大麻事犯が増加し、検挙人員が過去最多を更新している。また、大麻ワックス等の大麻濃縮物や大麻を含有した食品等、乱用形態の多様化が見られる。一方、大麻の代替品として、大麻の幻覚成分である $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC)や  $\Delta^8$ -THC と

A. 研究目的

本研究は、大麻の代替品として国内流入が急増して問題となっている大麻成分由来化合物に

構造類似の大麻成分由来化合物を含有する製品の国内流入が急増している。Hexahydrocannabinol (HHC)は、大麻草から微量に検出されることが報告されているが、大麻成分 Cannabidiol (CBD)を原料として容易に合成することが可能である。電子タバコ用リキッドカートリッジやハーブ製品等として、令和3年頃からインターネット上等で流通していた。HHCは3つの不斉炭素を有するが、流通製品からは、9位のメチル基の立体のみが異なる2種類の異性体(11 $\alpha$ -HHC及び11 $\beta$ -HHC)が同時に検出される。HHCは令和4年3月に指定薬物に指定されたが、規制後すぐに類似の化合物を含有する製品が出現している。規制化合物であるHHC、 $\Delta^9$ -THC及び $\Delta^8$ -THCの水酸基をアセチル化したHHC-*O*-acetate、 $\Delta^9$ -THC-*O*-acetate ( $\Delta^9$ -THC-ACT,  $\Delta^9$ -THC-O) 及び  $\Delta^8$ -THC-*O*-acetate ( $\Delta^8$ -THC-ACT,  $\Delta^8$ -THC-O)は、新たに国内流入が認められている代表的な大麻成分由来化合物である。しかし、これら化合物について、今までに化学的特性及び薬理的特性に関する科学的報告はない。

本研究では、 $\Delta^9$ -THC-*O*-acetate、 $\Delta^8$ -THC-*O*-acetate、11 $\alpha$ -HHC-*O*-acetate (11 $\alpha$ -HHC-ACT, 11 $\alpha$ -HHC-O) 及び 11 $\beta$ -HHC-*O*-acetate (11 $\beta$ -HHC-ACT, 11 $\beta$ -HHC-O)の計4種類の大麻成分由来化合物を対象として、*in vitro*による代謝を検討し、指定薬物指定の検討に必要な科学的データを取得する。

アセチル化された薬物が強い薬理作用を示す代表的な例として、ヘロインがよく知られている<sup>1)</sup>。ヘロインは、体内で加水分解されモルヒネを生成する。体内での薬物の酵素的加水分解には、肝臓を始めとした多くの組織に分布しているカルボキシエステラーゼの寄与が大きく<sup>2)</sup>、これを利用して医薬品の薬理作用を効率的に発揮させる目的でプロドラッグも多く開発されている。代表例には、抗がん剤イリノテカンがあり、体内で加水分解されて活性代謝物SN-38を生成することが知られてい

る<sup>3-5)</sup>、カルボキシエステラーゼ (carboxylesterase, CES)にはCES1とCES2があり、これら2分子種が主要な酵素である<sup>2,5)</sup>。また、ヒトにはCES3-CES6も存在することが知られている<sup>6)</sup>。これらは、マウス等の実験動物の血漿にも存在することが知られているが、ヒトでは血漿にはCES1とCES2は存在しないと言われている<sup>5)</sup>。一方、血漿には、別のエステラーゼの存在も知られている<sup>5)</sup>。これらのことから、ヒトが $\Delta^9$ -THC-*O*-acetate、 $\Delta^8$ -THC-*O*-acetate、11 $\alpha$ -及び11 $\beta$ -HHC-*O*-acetateを摂取した場合、*in vivo*で加水分解されて、規制化合物である $\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、11 $\alpha$ -HHC及び11 $\beta$ -HHCが生成すると推定される (Fig. 1, Fig. 2)。ヒトでは、これを検証することは難しいため、CES1及びCES2が発現しているヒト肝臓マイクロゾーム (HLM)<sup>2,5)</sup>を用いて*in vitro*代謝実験を行い、体内における酵素的加水分解の蓋然性を示す。

本研究は、監視指導・麻薬行政と密接に連携して遂行され、指定薬物制度に即して実施される。

## B. 研究方法

### 被検薬物

$\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、11 $\alpha$ -HHC および 11 $\beta$ -HHC、さらにこれらのアセチル化体は、国立医薬品食品衛生研究所より供与された。

### 酵素的加水分解の定量的解析:

$\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、11 $\alpha$ -HHC および 11 $\beta$ -HHCのアセチル化体を用い、ヒト肝臓マイクロゾーム (HLM)により酵素化学的加水分解が起こるか否か検討した。各カンナビノイドのアセチル化体は、1 mg/mL DMSO 溶液を終濃度 50  $\mu$ g/mL となるよう加えた。DMSOの終濃度 1%。酵素反応は 100 mM Tris-HCl (pH 7.4)で行い、150 Pooledヒト肝臓マイクロゾーム (HLM) (Corning Gentest, Discovery Life Sciences) を酵素源として 10  $\mu$ g protein の存在下、終容量 200  $\mu$ L として 37°C でインキュベーションを行い、BEH Shield RP18 Column を装着した ACQUITY UPLC (Waters)により解析した。

解析は $\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、11 $\alpha$ -HHC および

11 $\beta$ -HHC と、各々のアセチル化体を標品とした絶対検量線法で実施した。

分析条件は

Equipment

: ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Milford, MA)

Column:

: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Column, 130 Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  100 mm

Column temperature: 40°C

Sample temperature: 4°C

Injection volume: 10  $\mu$ L

Flow rate: 0.2 mL/min

Mobile phase:

Solvent A: water+0.1% formic acid

Solvent B: acetonitrile

0-20 min A:20%; B:80%

対照としては、予め熱変性させた HLM を用いることで、加水分解が酵素化学的か否かを検討した。また、カルボキシエステラーゼの特異的阻害剤である Bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP)<sup>3)</sup> を前処理した HLM を用いて、加水分解反応に関わる酵素がカルボキシエステラーゼか否かを検討した。

酵素的加水分解の定性的解析:

定量的解析と同様の加水分解反応を行い、生成物の m/z を UPLC-QTOFMS 解析によって検証した。

分析条件は

UPLC

カラム: CORTECS C18 (2.1 mm i.d.  $\times$  150 mm, 2.7  $\mu$ m, Waters)

移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液,

移動相 B: 0.1 %ギ酸アセトニトリル溶液,

グラジエント条件:

A/B 90/10-35/65(10min)-30/70(20min)-

20/80(30min)

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

UPLC/MS

機器: TripleTOF 6600 LC/MS/MS system (AB SCIEX, MA, USA)/

イオン化: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 positive mode

Source temperature: 550°C

gas: N<sub>2</sub>

ion source gas 1: 50 psi; ion source gas 2: 50 psi

curtain gas: 25 psi

ion spray voltage: 5500 V

declustering potential: 80 V

Collision Energy: 10V

mass spectral range: m/z 100–650

統計解析:

3 群の統計解析は、One way ANOVA 及び post-hoc test として Dunnett's multiple comparisons test を実施した。有意水準は p<0.05 とした。

C. 結果

$\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC, 11 $\alpha$ -HHC および 11 $\beta$ -HHC のアセチル化体を用い、HLM と 37°C でインキュベーションした時、加水分解で生成すると予想した  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC, 11 $\alpha$ -HHC および 11 $\beta$ -HHC 各々の合成標品と同一の保持時間にそれぞれ検出され、反応時間依存的に増加し、60 分後にはアセチル化体は殆ど残存しなかった (Figs. 3-8)。これらの反応は予め煮沸した HLM によっては起こらなかった。また、カルボキシエステラーゼ阻害剤 BNPP とプレインキュベーションした HLM を酵素源とした時は、加水分解は殆ど起こらなかった (Figs. 9-17)。

次に、酵素的加水分解生成物のマススペクトルを LC-QTOFMS によって定性分析により検証した (Fig. 18)。 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC, 11 $\alpha$ -HHC および 11 $\beta$ -HHC のアセチル化体から、加水分解で生成

した主要ピークのプロトン付加分子イオンは、各々  $\Delta^9$ -THC ( $m/z=315.2319$ ),  $\Delta^8$ -THC ( $m/z=315.2319$ ),  $11\alpha$ -HHC ( $m/z=317.2745$ ) および  $11\beta$ -HHC ( $m/z=317.2745$ ) とそれぞれ合致した。 $\Delta^9$ -THC のアセチル化体からは、 $\Delta^9$ -THC 以外に微量ではあるものの複数の代謝物及び非酵素的生成物が認められた (Fig. 18). また、2種の Oxo 体 ( $m/z=329.211$ ) と 1種の COOH 体 ( $m/z=345.206$ ) の存在も推定された。

#### D. 考察

本研究では、 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC のアセチル化体が生体内で加水分解されるか否か検討を行った。HLM 及び対照として煮沸で酵素を失活させた HLM を用いることで、酵素化学的加水分解反応を確認した。これらは、いずれも非酵素的に一部分解するとともに、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベーションした時、HLM によって酵素化学的に加水分解され、それぞれ、 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC になることが明らかだった。この反応は CES の特異的阻害剤 BNPP により著しく阻害されたことから、HLM に発現している CES1 と CES2 のいずれか、あるいは両方の関与が考えられた。これらのことから、現時点では規制されていない、カンナビノイド類のアセチル化体  $\Delta^9$ -THC-O,  $\Delta^8$ -THC-O,  $11\alpha$ -HHC-O および  $11\beta$ -HHC-O を摂取した場合、生体内で規制薬物の  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC になることの蓋然性が担保された。

$\Delta^9$ -THC-O,  $\Delta^8$ -THC-O,  $11\alpha$ -HHC-O および  $11\beta$ -HHC-O の生体内で酵素化学的加水分解は、反応時間依存的であった。 $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC の構造の違いは二重結合の位置が異なるのみであるが、 $\Delta^8$ -THC のアセチル化体の方が  $\Delta^9$ -THC-O,  $11\alpha$ -HHC-O および  $11\beta$ -HHC-O よりも加水分解され易い傾向があった。もし、アセチル化体そのものに薬理作用が存在しないのであれば、薬理作用の発現に加水分解が必要となるため、酵素反応に時間を要する分、薬理作用の出現に遅延が

出ると推察される。本研究で用いた条件下  $37^\circ\text{C}$ , 60 分後にはアセチル化体は殆ど残存しなかったことから、用いる用量にもよるであろうが、比較的速度やかに脱アセチル化されると考えられる。ヘロインの例にもあるように、アセチル化体の方が脂溶性が高く脳へ分布しやすくなる可能性もある。これは、投与方法にも影響を受けるであろう。CES1 は肝臓に高発現しており、CES2 は小腸に高発現している<sup>2, 5)</sup>。また、予備的検討で、ヒト血漿 (Pooled) と  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC のアセチル化体を  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベーションした結果、脱アセチル化は殆ど進まなかった (データ未掲載)。ヒトの血漿には CES1 及び CES2 は発現していないと知られているため<sup>5)</sup>、このことは、肝臓での代謝の重要性を支持する。しかし、今回の検討では、ヒト血漿で酵素的加水分解を受ける陽性対照を用いていないため、引き続き検討を行う必要がある。これらのことに鑑み、経口投与の場合には小腸や肝臓を経由するため脳に移行する前に脱アセチル化する割合が多いと推定される。

$\Delta^9$ -THC-O,  $\Delta^8$ -THC-O,  $11\alpha$ -HHC-O および  $11\beta$ -HHC-O の *in vitro* 代謝物としての  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC,  $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC の生成は、上述の UPLC による標準品との保持時間の一致での検証だけでなく、LC-QTOFMS でも検証した。この検出方法では、他の代謝物も検出し得るが、本研究では、pooled HLM を酵素源に用いており、これは調製の過程で washing を経ていると推定される。従って、HLM に発現している薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (P450) による酸化反応に必要な補酵素 NADPH や UDP-グルクロン酸転移酵素の補酵素 UDP-グルクロン酸がほとんど含まれていないと考えるのが妥当である。これを裏付けるように、LC-QTOFMS では、確認されたのは脱アセチル化体の生成が主要な反応である (Fig. 18)。唯一、 $\Delta^9$ -THC-O では、脱アセチル化によって生成した  $\Delta^9$ -THC とともに、僅かに、2種の Oxo 体 ( $m/z=329.211$ ) と 1種の COOH 体

(m/z=345.206)と推測される化合物が生成していた。また、僅かではあるが非酵素的な分解物生成しており、 $\Delta^9$ -THC-O では、 $\Delta^8$ -THC-O、 $11\alpha$ -HHC-O および  $11\beta$ -HHC-O より明白だった。 $\Delta^9$ -THCは $\Delta^8$ -THCよりも化学的に不安定だと言われており<sup>7, 8)</sup>、そのことを支持する結果と考えられた。また、外から補酵素を加えない条件であったことから、代謝には内在性の補酵素が利用されたと考えられ、 $\Delta^9$ -THCの方が $\Delta^8$ -THCより酸化的代謝を受け易いと推定される。

実際の生体内では、細胞質の酵素や補酵素も存在することを考慮すると、本研究は、特に脱アセチル化反応に着目して検証したものと言える。CES1及びCES2の関与については、今後、組換え酵素発現マイクロゾームを用いた検討を行うことが望ましい。それにより、関与する分子種を特定するとともに、小腸の関与についても考察ができる。脱アセチル化後は、脳に分布するだけでなく、P450による酸化やUDP-グルクロン酸転移酵素による抱合など様々な代謝を受けると推定される。それらの過程は、規制薬物 $\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、 $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHC自身の代謝である。 $\Delta^9$ -THCの9位の二重結合は酸により容易に8位に移動し、 $\Delta^8$ -THCとなる<sup>7, 8)</sup>。これの方が安定であるため、特に $\Delta^8$ -THCでは代謝研究が進んでいる。また、 $\Delta^9$ -THCでも類似の代謝が起こると報告されている<sup>7-9)</sup>。さらに、9位に結合した11位のメチル基は酵素的酸化を受けやすく、P450によってカルボン酸体が生成することも分かっている<sup>10)</sup>。カルボン酸体はグルクロン酸抱合を受けると考えられる<sup>9, 11)</sup>。今後、 $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHCについては更なる代謝物の確認も必要と思われるが、脱アセチル化反応が速やかであるため、脱アセチル化により生成する $\Delta^9$ -THC及び $\Delta^8$ -THCの代謝様式は概ね既知のものと同じと考えることは問題ないと思われる。本研究では、加水分解による規制薬物 $\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、 $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHCの生成の蓋然性が担保できた点で所期の目的を果たせたと考える。

## E. 結論

$\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、 $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHCのアセチル化体は、生体内で酵素化学的加水分解を受け、規制薬物 $\Delta^9$ -THC、 $\Delta^8$ -THC、 $11\alpha$ -HHC および  $11\beta$ -HHCを生成すると考えられる。

これらの反応には、少なくともHLMのカルボキシエステラーゼが関与することが示唆された。

## F. 参考文献

- 1) Potter PM, Wadkins RM: Carboxylesterases-- detoxifying enzymes and targets for drug therapy. *Curr Med Chem.* 2006; 13(9): 1045-1054.
- 2) Satoh T, Hosokawa M: The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:257-288.
- 3) Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hakusui H, Nagai E: Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase. *Biol Pharm Bull.* 1994;17(5):662-664.
- 4) Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Boiocchi M: Pharmacogenetics of irinotecan. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2003;3(3):225-237.
- 5) 今井輝子: カルボキシルエステラーゼ研究の現状とプロドラッグ体内動態の予測. *薬剂学*, 2011;71:198-206.
- 6) Holmes RS, Cox LA, Vandenberg JL: A new class of mammalian carboxylesterase CES6. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2009;4(3):209-217.
- 7) 山本 郁男, 吉村 英敏: 大麻成分の代謝と薬理作用. *衛生化学*. 1982;28(5):233-248.
- 8) 山本 郁男: 大麻主成分の代謝と薬理-毒性. *薬学雑誌*. 1986;106(7):537-561.
- 9) White RM: Cannabidiol and  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol: Cannabinoids of

Rising Interest and Concern. *Forensic Sci Rev.*  
2023;35:27-45.

- 10) Watanabe K, Narimatsu S, Yamamoto I,  
Yoshimura H: Oxygenation mechanism in  
conversion of aldehyde to carboxylic acid  
catalyzed by a cytochrome P-450 isozyme. *J  
Biol Chem.* 1991;266(5):2709-2711
- 11) Bianchi V, Donzelli G: Rapid reversed-phase  
high-performance liquid chromatographic  
method for the assay of urinary 11-nor-delta  
9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid and  
confirmation of use of cannabis derivatives. *J  
Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 675(1):  
162-167.

G. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表  
学会発表

- 1) Jorge Carlos Pineda Garcia, 趙 爽利、李 任  
時、花尻 瑠理、出水庸介、田中嘉孝、石井  
祐次:  $\Delta^9$ -THC-acetate および $\Delta^8$ -THC-acetate  
のヒト肝臓ミクロゾームによる酵素化学的加水  
分解と $\Delta^9$ -THC および $\Delta^8$ -THC 生成. 日本薬学  
会第 143 年会 (2023.3.26, 札幌).

論文発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

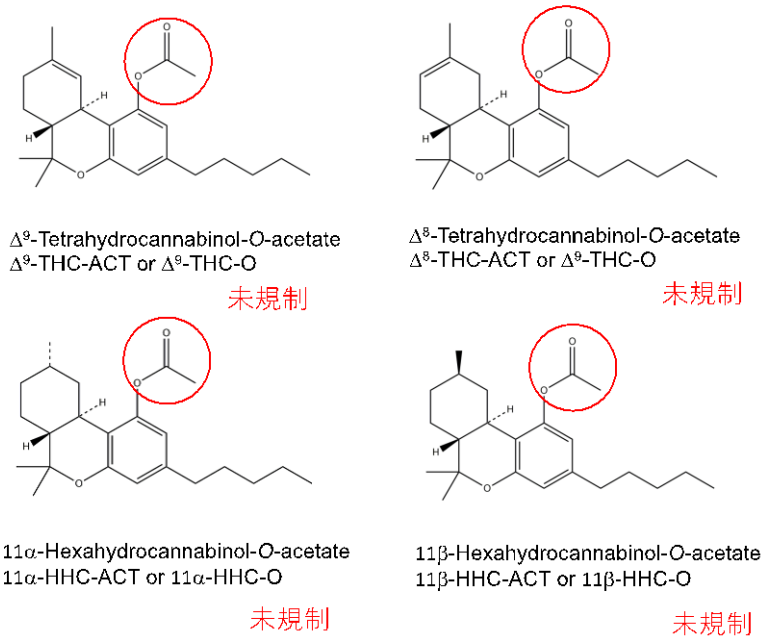


Fig. 1 *In vitro* での加水分解反応の検討を行う対象化合物

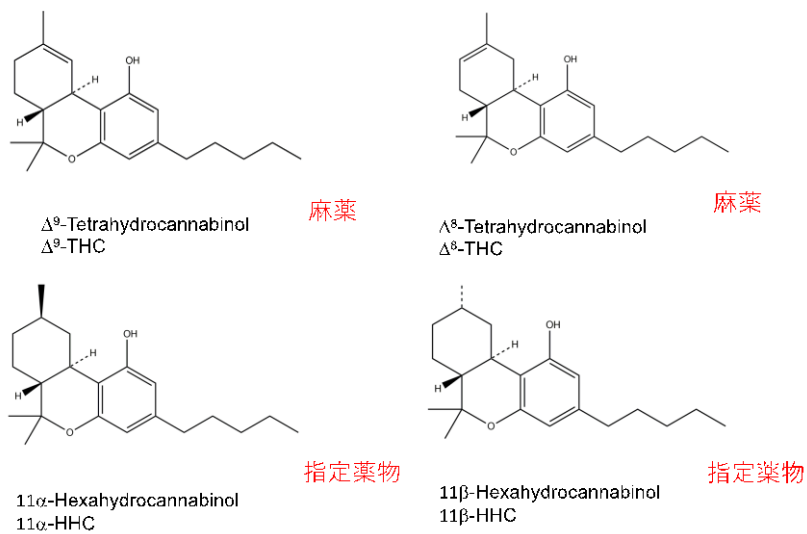


Fig. 2 Δ<sup>9</sup>-THC-ACT, Δ<sup>8</sup>-THC-ACT, 11α-HHC-ACT 及び 11β-HHC-ACT の *in vitro* での酵素化学的加水分解反応で生成することが予想される物質

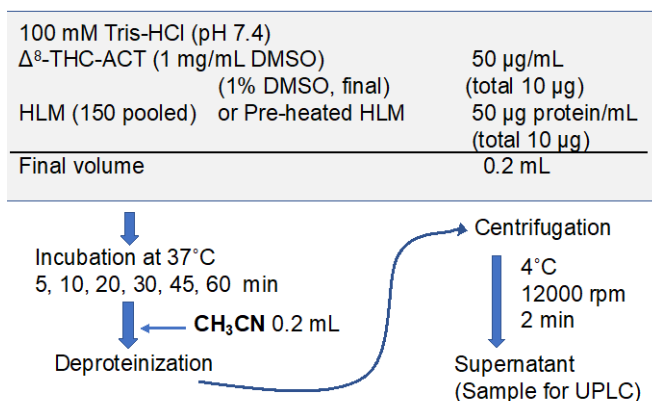


Fig. 3. HLM を酵素源とした酵素化学的加水分解反応  
反応条件:  $\Delta^8$ -THC-ACT を例として

Equipment  
: ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Milford, MA)  
Column:  
: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Column,  
130 Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  100 mm  
Column temperature: 40°C  
Sample temperature: 4°C  
Injection volume: 10  $\mu$ L  
Flow rate : 0.2 mL/min  
Mobile phase :  
Solvent A: water+0.1% formic acid  
Solvent B: acetonitrile  
0-20 min A: 20%; B:80%

Fig. 4. UPLC における分析条件

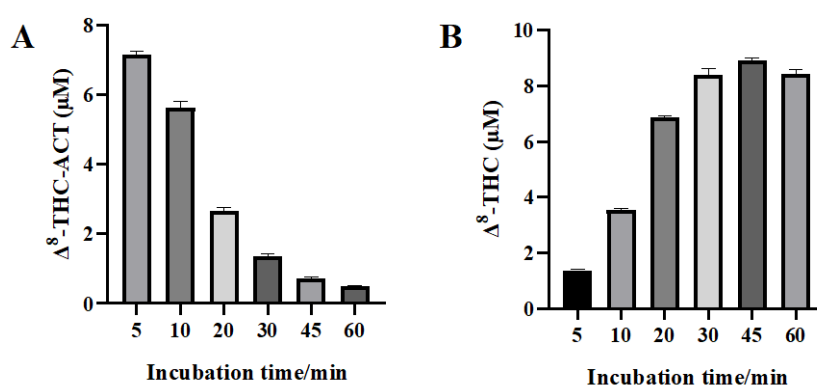


Fig. 5. Time course of  $\Delta^8$ -THC-ACT metabolism and  $\Delta^8$ -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with  $\Delta^8$ -THC-ACT with a incubator at 37°C. (A)  $\Delta^8$ -THC-ACT metabolism and (B)  $\Delta^8$ -THC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.



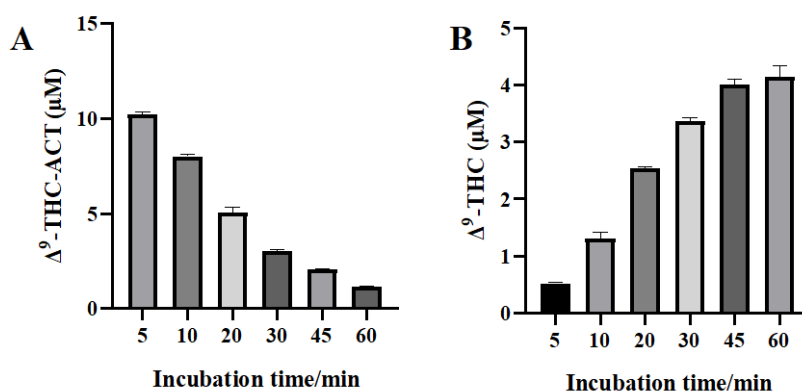


Fig. 6. Time course of  $\Delta^9$ -THC-ACT metabolism and  $\Delta^9$ -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with  $\Delta^9$ -THC-ACT with a incubator at 37°C. (A)  $\Delta^9$ -THC-ACT metabolism and (B)  $\Delta^9$ -THC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.

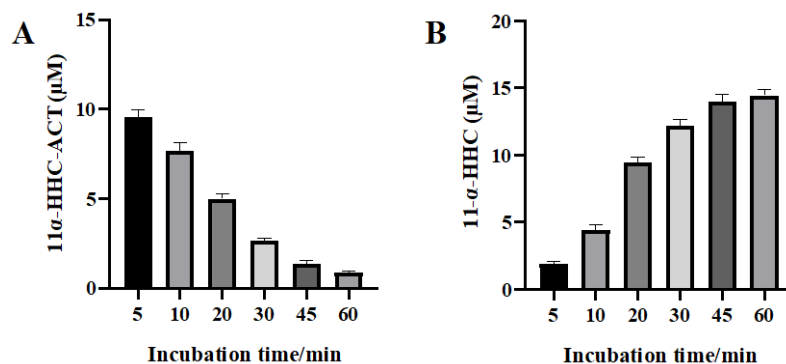


Fig. 7. Time course of  $11\alpha$ -HHC-ACT metabolism and  $11\alpha$ -HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with  $11\alpha$ -HHC-ACT with a incubator at 37°C. (A)  $11\alpha$ -HHC-ACT metabolism and (B)  $11\alpha$ -HHC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.

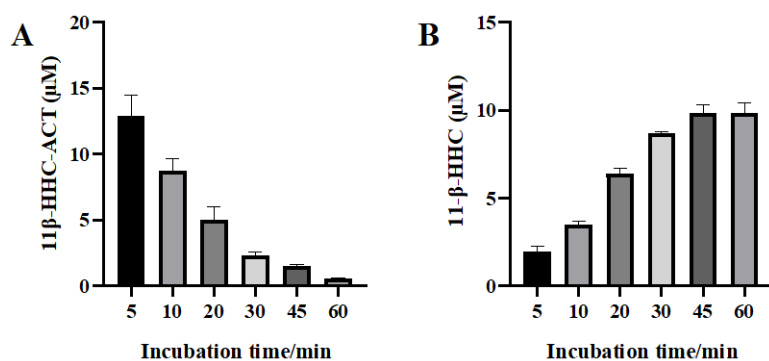


Fig. 8. Time course of 11β-HHC-ACT metabolism and 11β-HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with 11β-HHC-ACT with a incubator at 37°C. (A) 11β-HHC-ACT metabolism and (B) 11β-HHC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean ± SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.

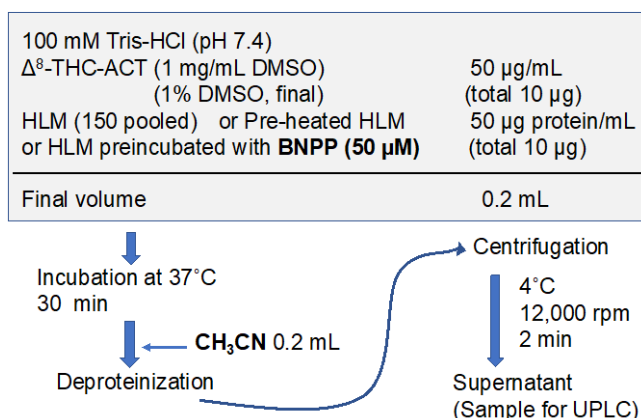


Fig. 9. HLM を酵素源とした酵素化学的加水分解反応: CES 阻害剤 BNPP の影響  
反応条件: Δ<sup>8</sup>-THC-ACT を例として. HLM は, 100 μM BNPP と 10 min preincubation (final 50 μM).

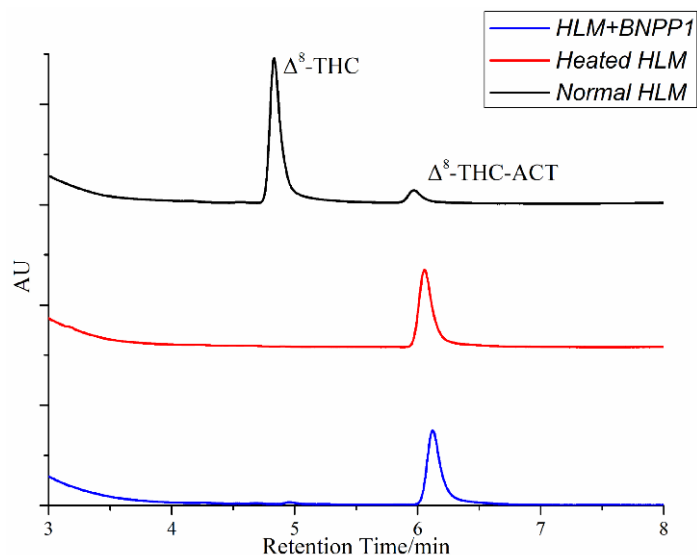


Fig. 10. UPLC-chromatogram of  $\Delta^8$ -THC-ACT metabolism and  $\Delta^8$ -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with  $\Delta^8$ -THC-ACT with at 37°C for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

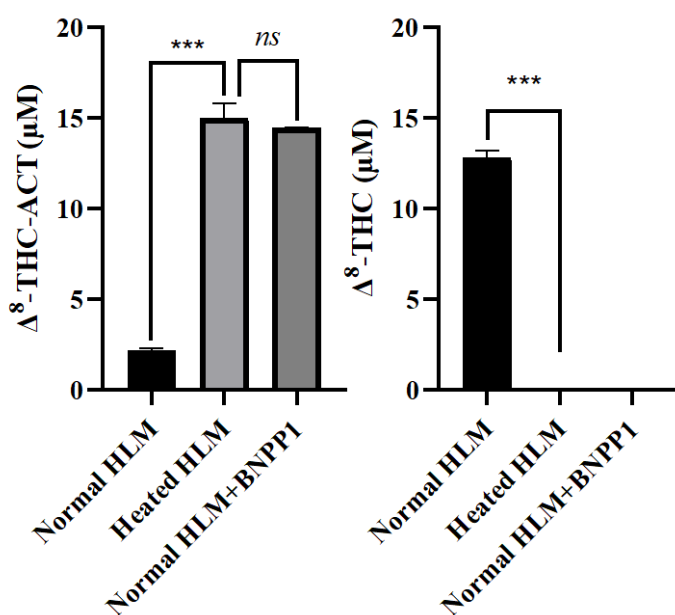


Fig. 11. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on  $\Delta^8$ -THC-ACT metabolism and  $\Delta^8$ -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with  $\Delta^8$ -THC-ACT at 37°C for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of  $\Delta^8$ -THC-ACT and  $\Delta^8$ -THC were determined. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: \*\*\*  $P < 0.001$

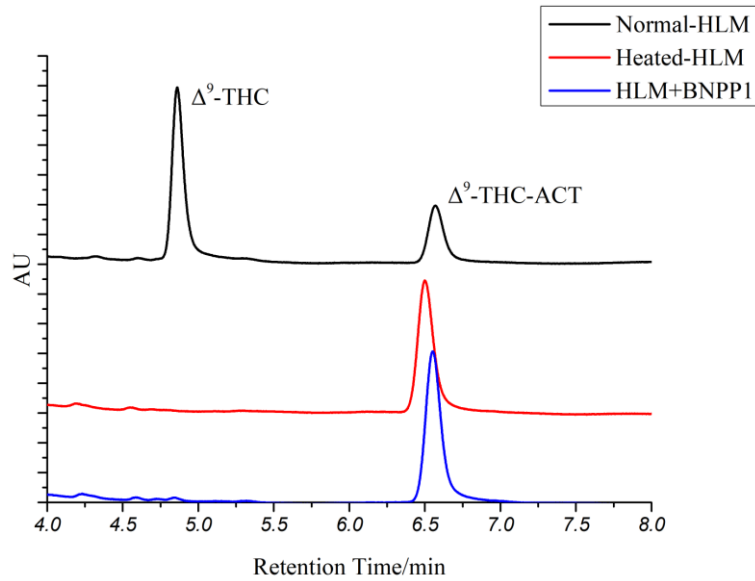


Fig. 12. UPLC-chromatogram of  $\Delta^9$ -THC-ACT metabolism and  $\Delta^9$ -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with  $\Delta^9$ -THC-ACT at 37°C for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

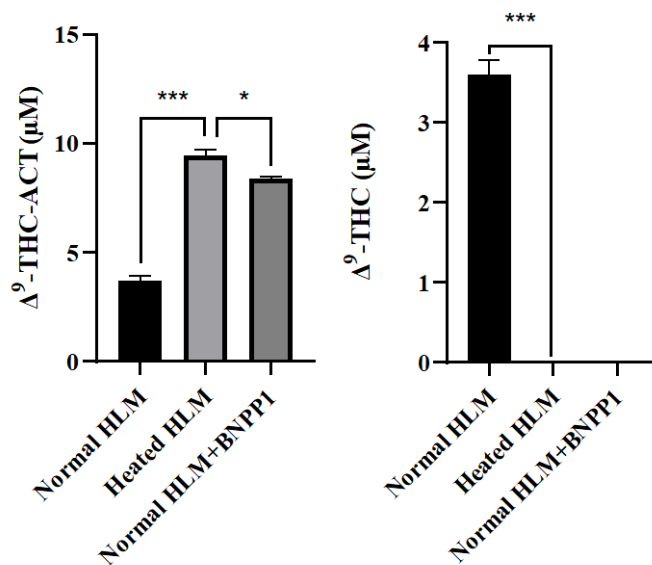


Fig. 13. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on  $\Delta^9$ -THC-ACT metabolism and  $\Delta^9$ -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM) HLM were incubated with  $\Delta^9$ -THC-ACT at 37°C for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of  $\Delta^9$ -THC-ACT and  $\Delta^9$ -THC were determined. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: \*\*\*  $P < 0.001$

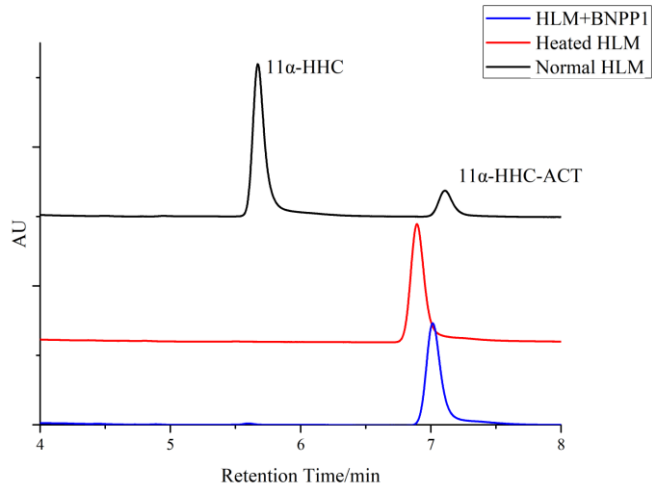


Fig. 14. UPLC-chromatogram of  $11\alpha$ -HHC-ACT metabolism and  $11\alpha$ -HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with  $11\alpha$ -HHC-ACT at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

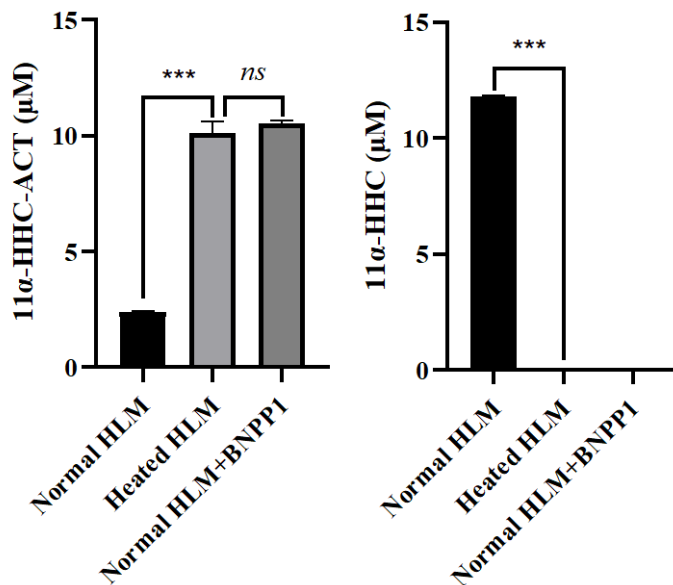


Fig. 15. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on  $11\alpha$ -HHC-ACT metabolism and  $11\alpha$ -HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM) HLM were incubated with  $11\alpha$ -HHC-ACT at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of  $11\alpha$ -HHC-ACT and  $11\alpha$ -HHC were determined. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: \*\*\*  $P < 0.001$

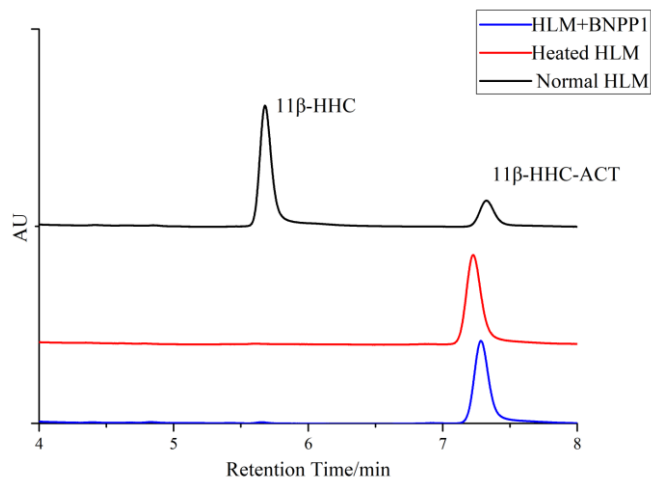


Fig. 16. UPLC-chromatogram of 11β-HHC-ACT metabolism and 11β-HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with 11β-HHC-ACT at 37°C for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

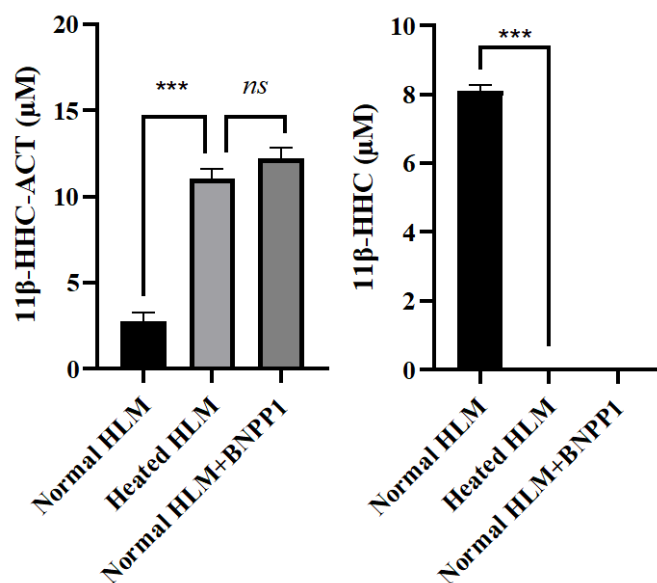


Fig. 17. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on 11β-HHC-ACT metabolism and 11β-HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM) HLM were incubated with 11β-HHC-ACT at 37°C for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of 11β-HHC-ACT and 11β-HHC were determined. Each bar represents the mean ± SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: \*\*\* P<0.001

Fig. 18  $\Delta^9$ -THC-acetate,  $\Delta^8$ -THC-acetate,  $11\alpha$ -HHC-acetate 及び  $11\beta$ -HHC-acetate の HLM による酵素化学的加水分解: UPLC-QTOFMS による定性分析

## 1. 測定条件

### UPLC

カラム: CORTECS C18 (2.1 mm i.d. x 150 mm, 2.7  $\mu$ m, Waters)

移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液, 移動相 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液,

グラジエント条件: A/B 90/10-35/65(10min)-30/70(20min)-20/80(30min)

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

### UPLC/MS

機器: TripleTOF 6600 LC/MS/MS system (AB SCIEX, MA, USA)/

イオン化: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

positive mode

Source temperature: 550°C

gas: N<sub>2</sub>

ion source gas 1: 50 psi; ion source gas 2: 50 psi

curtain gas: 25 psi

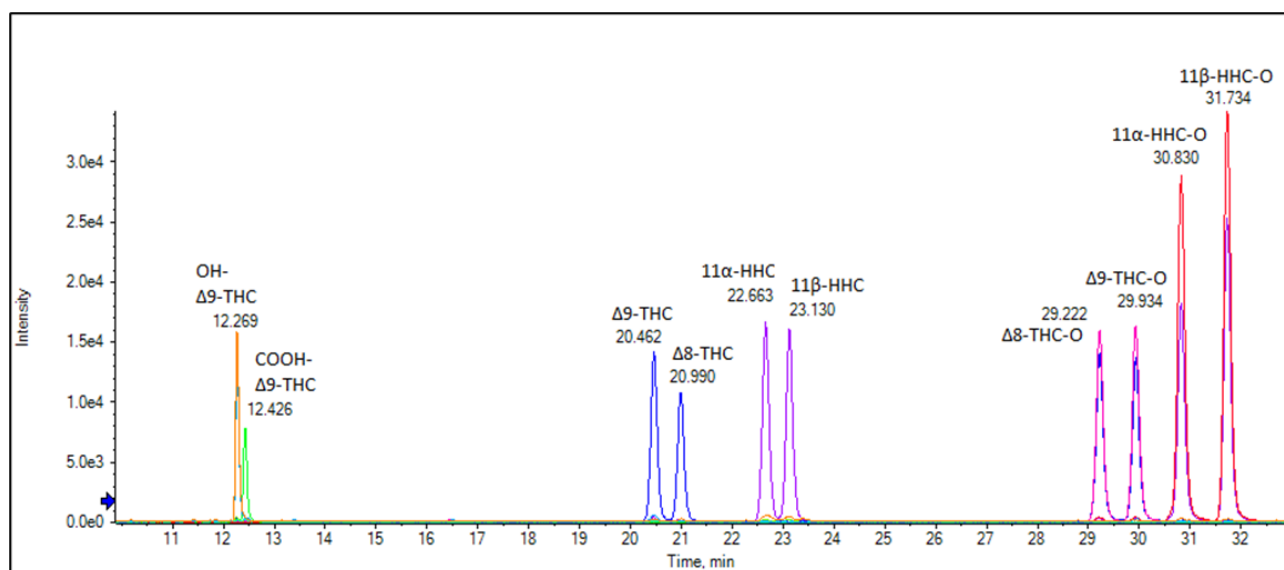
ion spray voltage: 5500 V

declustering potential: 80 V

Collision Energy: 10V

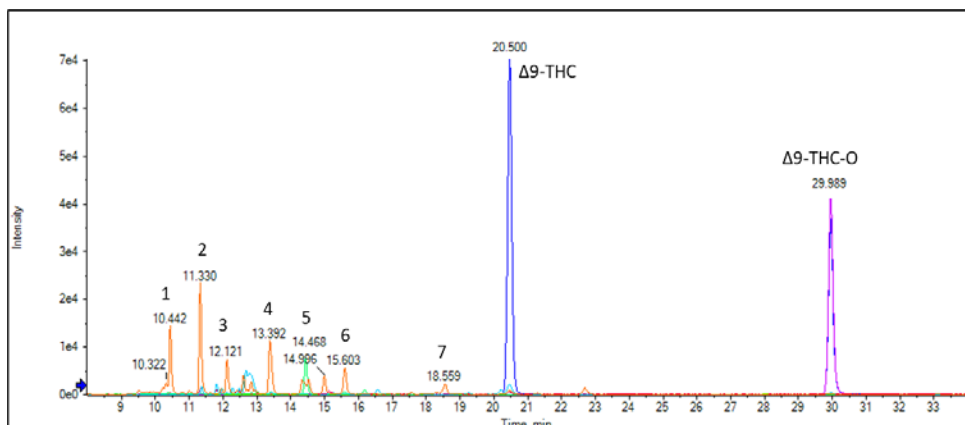
mass spectral range: m/z 100–650

## 2. 標準溶液 (10 化合物混合溶液 50 ng/mL)

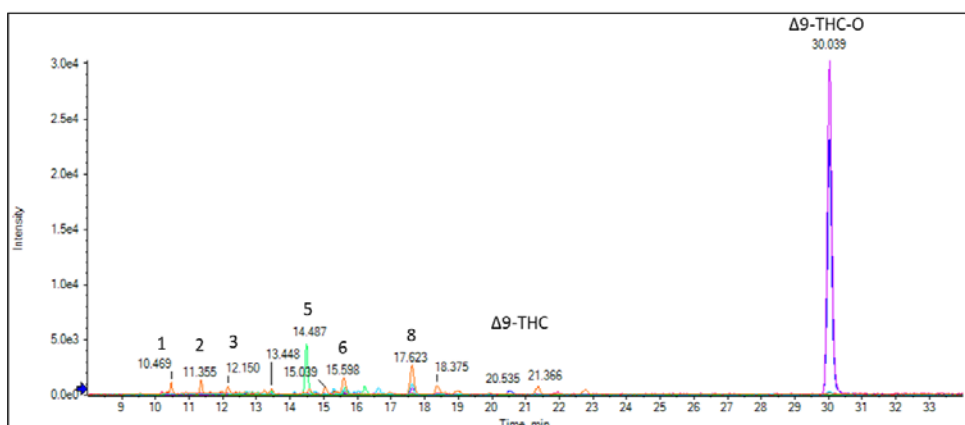


### 3. 試料測定

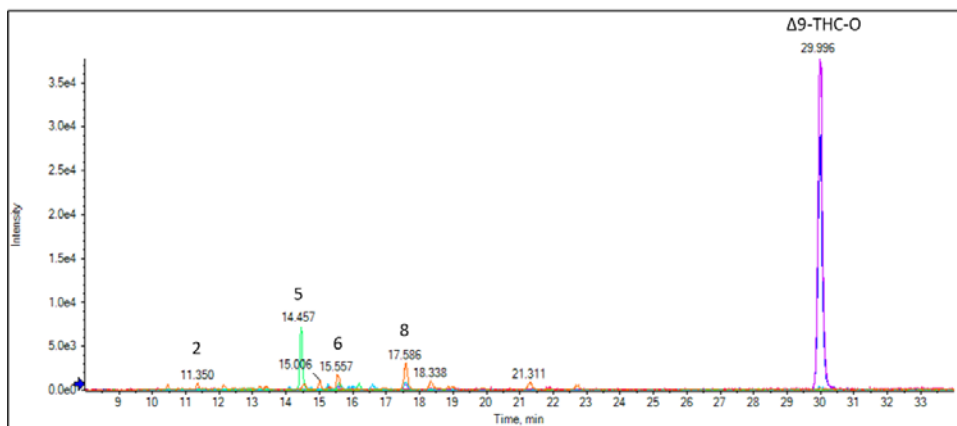
#### ① delta9-THC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 13 参照)



#### ② delta9-THC-O + BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 13 参照)



#### ③ delta9-THC-O + 加熱タンパク変性前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 13 参照)



XIC モニターイオン (delta9 and delta8-THC-O)

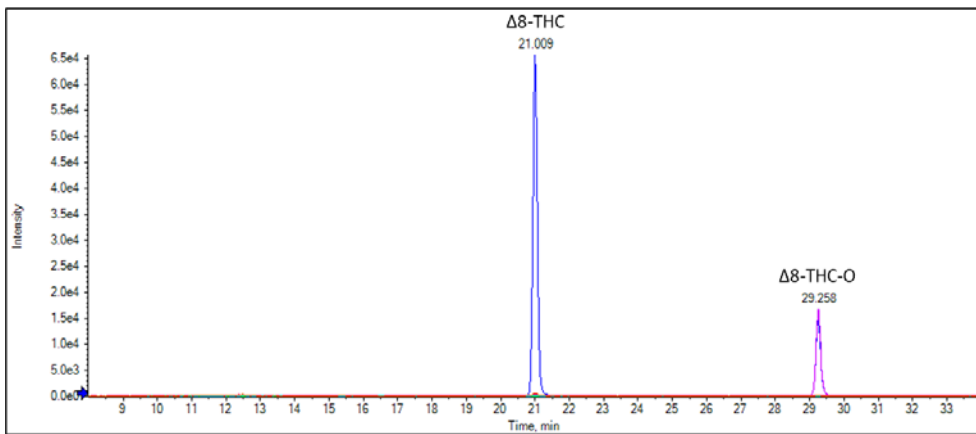
No.	m/z	Compound
1	315.2319	THC
2	357.2424	THC-O
3	331.2268	OH-THC
4	329.2111	oxo-THC
5	349.2373	diOH-HHC
6	345.206	COOH-THC
7	313.2162	OH-THCのフラグメントイオン

各ピークの TOFMS による推定組成式

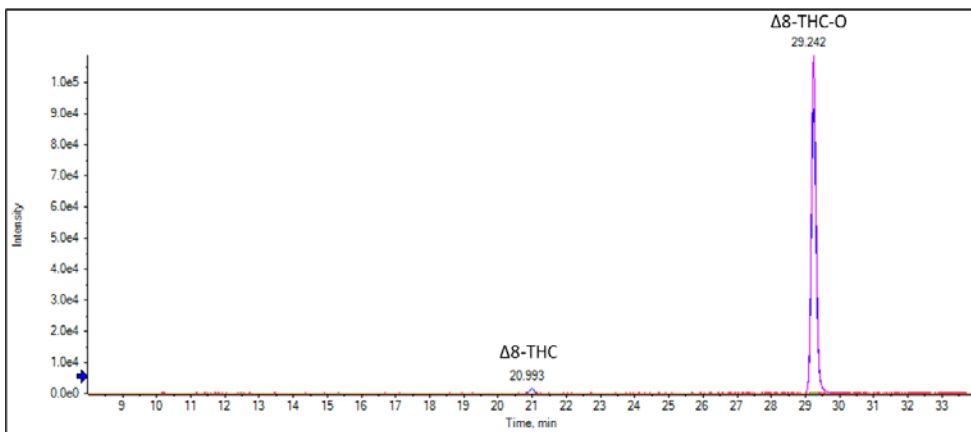
Peak No	Formula	m/z	mDa
1	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	329.2111	0.2
2	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	347.2217	0.1
3	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	347.2217	-1
4	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	329.2111	0.4
5	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	345.206	0.2
6	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	329.2111	-0.6
7	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	329.2111	0.1
8	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	371.2217	-0.2



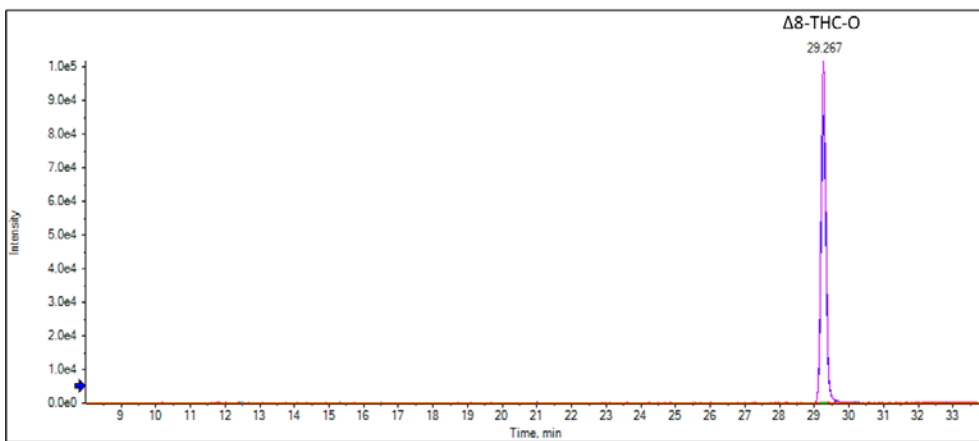
① delta8-THC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 11 参照)



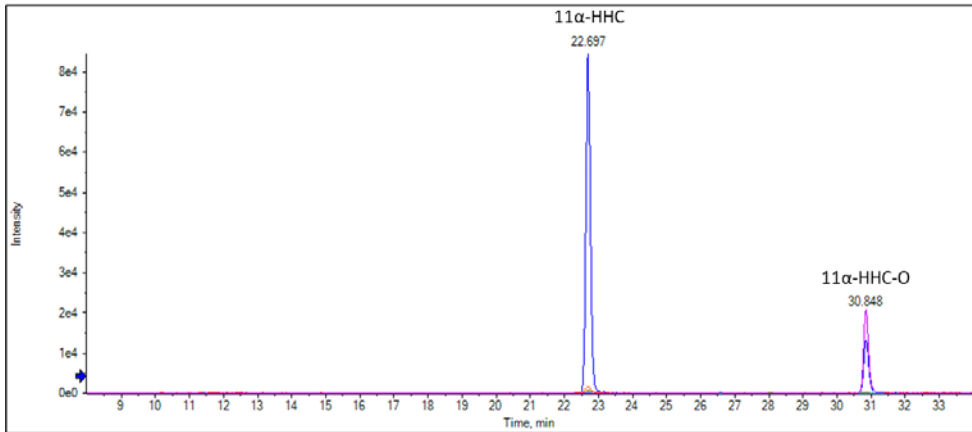
② delta8-THC-O+BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 11 参照)



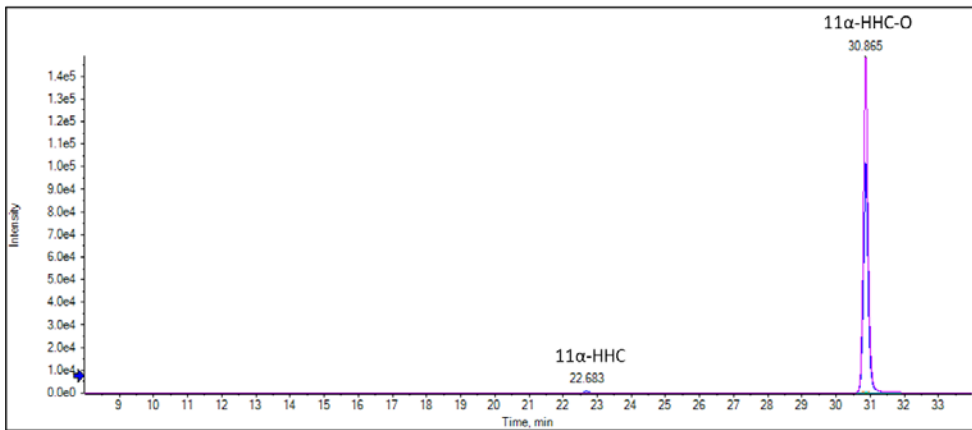
③ delta8-THC-O+加熱タンパク変性前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 11 参照)



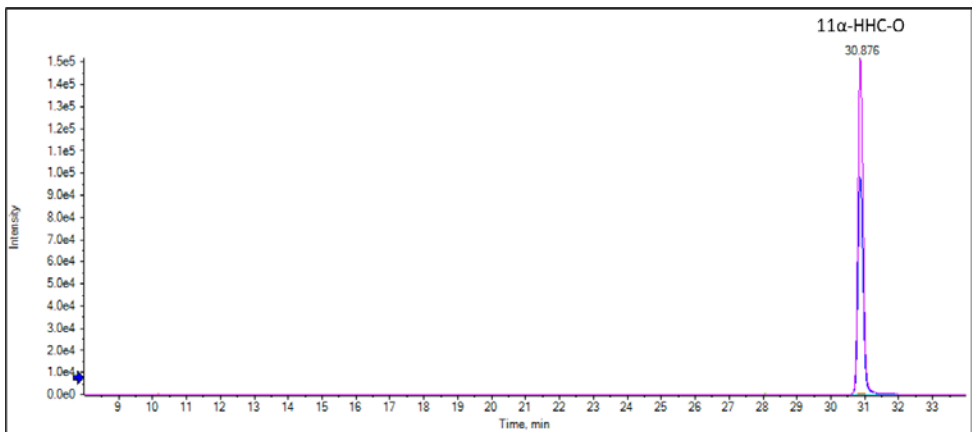
① 11 $\alpha$ -HHC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 15 参照)



② 11 $\alpha$ -HHC-O+BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 15 参照)



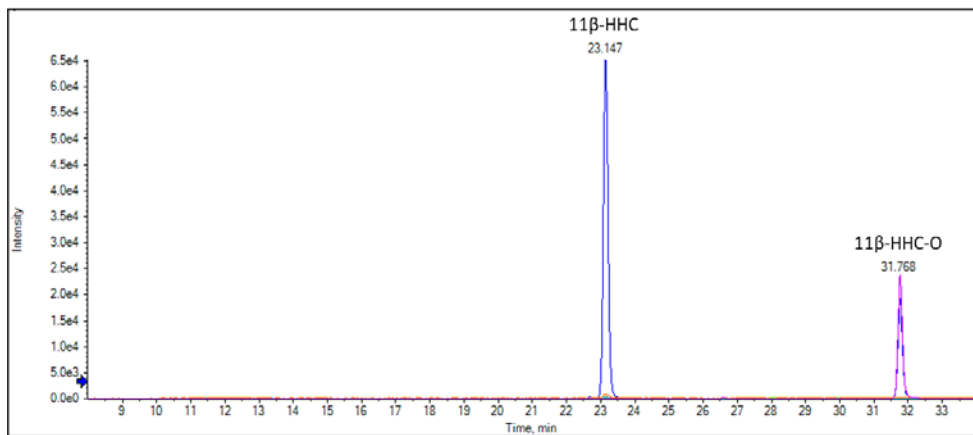
③ 11 $\alpha$ -HHC-O+加熱タンパク変性前処理 反応溶液(代表1例: Fig. 15 参照)



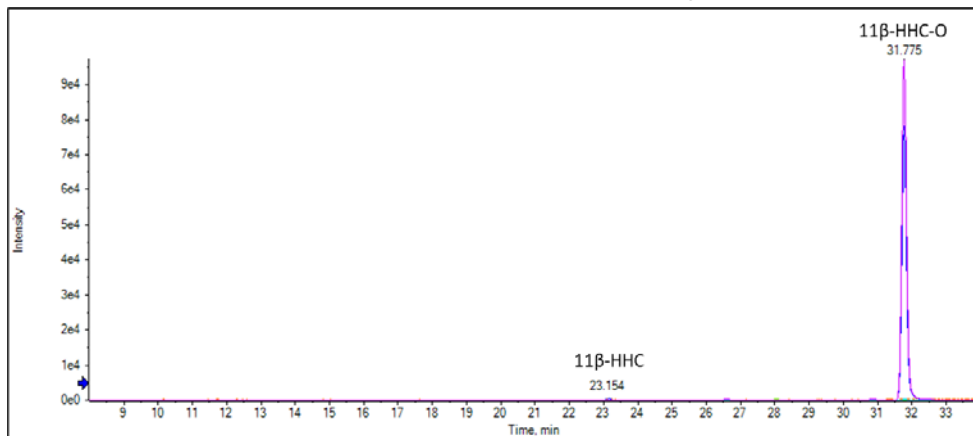
XIC モニターイオン(11 $\alpha$ -HHC-O and 11 $\beta$ -HHC-O)

No.	m/z	Compound
1	317.2475	HHC
2	359.2581	HHC-O
3	333.2424	OH-HHC
4	331.2268	oxo-HHC
5	349.2373	diOH-HHC
6	347.2217	COOH-HHC
7	315.2319	OH-HHCのフラグメントイオン

① 11 $\beta$ -HHC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 17 参照)



② 11 $\beta$ -HHC-O+BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 17 参照)



③ 11 $\beta$ -HHC-O+加熱タンパク変性前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 17 参照)

